

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): MOCKEL et al.

Appln. No.: 09 |
Series ↑ | ↑ Serial No.
Code

Group Art Unit: Not Yet Assigned

Filed: November 29, 2000

Title: NOVEL NUCLEOTIDE SEQUENCES ENCODING THE
GPM GENE

Examiner: Not Yet Assigned
Atty. Dkt. PM 273989

990168BT

M#

Client Ref

Date: November 29, 2000

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

Application No.

199 58 160.6

Country of Origin

GERMANY

Filed

December 2, 1999

Respectfully submitted,

Pillsbury Madison & Sutro LLP
Intellectual Property Group

By Atty: Ann S. Hobbs

Reg. No. 36830

Sig: C. L. Hobbs

Fax: (202) 822-0944

Tel: (202) 861-3063

1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Tel: (202) 861-3000
Atty/Sec: ASH/JRH



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



jc760 u.s. pro
06/725178
1/29/00

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 58 160.6
Anmeldetag: 02. Dezember 1999
Anmelder/Inhaber: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE
Bezeichnung: Neue für das gpm-Gen codierende
Nukleotidsequenzen
IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Agurke

Neue für das gpm-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das gpm-Gen codierende Nukleotidsequenzen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin unter 5 Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen das gpm-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, 10 insbesondere aber in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der 15 Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z. B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z. B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch 20 z. B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man 25 Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z. B. das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Lysin produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Biosynthesegene für L-
Aminosäuren amplifiziert und die Auswirkung auf die L-
Aminosäure-Produktion untersucht. Übersichtsartikel hierzu
findet man unter anderem bei Kinoshita ("Glutamic Acid
5 Bacteria", in: *Biology of Industrial Microorganisms, Demain*
and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, London, UK, 1985,
115-142), Hilliger (*BioTec* 2, 40-44 (1991)), Eggeling
(*Amino Acids* 6:261-272 (1994)), Jetten und Sinskey
(*Critical Reviews in Biotechnology* 15, 73-103 (1995)) und
10 Sahm et al. (*Annals of the New York Academy of Science*
782, 25-39 (1996)).

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue
15 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der
Humanmedizin, in der pharmazeutischen Industrie und
20 insbesondere in der Tierernährung Anwendung. Es besteht
daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte
Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere
L-Lysin, bereitzustellen.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind
25 damit nicht nur die Base sondern auch die Salze wie z. B.
Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid
aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine
Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

5 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

10 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Polynukleotid, Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Polynukleotid, das eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante, DNA ist.

15 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Polynukleotid, das eine RNA ist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Polynukleotid, Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

20 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
25 und gegebenenfalls
(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Vektor, enthaltend eines der genannten Polynukleotide

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung 5 einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit einer Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten 10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet 15 als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Phosphoglycerat-Mutase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des 20 Phosphoglycerat-Mutase-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin geeignet als Primer zur Herstellung von DNA von Genen, die für Phosphoglycerat-Mutase codieren, durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). 25

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden. 25

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte 30 RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid
5 gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Phosphoglycerat-Mutase und auch solche ein, die zu wenigstens 70 % identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit 10 dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die 15 insbesondere bereits eine L-Aminosäure produzieren, und in denen die für das gpm-Gen codierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder 20 mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA codiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität codiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert. 25

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol 30 herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt

für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind zum Beispiel die 5 bekannten Wildtypstämme

10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
15 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw.
15 Stämme, wie beispielsweise

20 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
25 *Corynebacterium glutamicum* DSM5715.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Phosphoglycerat-Mutase (EC 5.4.2.1) codierende gpm-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

25 Zur Isolierung des gpm-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das
30 Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory

Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ-Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

10 Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirt eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αMCR, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Auf diese Weise wurde die neue für das gpm-Gen codierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des gpm-Genproduktes dargestellt.

Codierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z. B.

5 Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h.

funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß

10 Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO. 2 ergeben, und

15 20 diese Aminosäuresequenzen codierende DNA-Sequenzen sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-

Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

5 Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des gpm-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 35

60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of
Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung
WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24,
5 229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and
Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides
(Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in
bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.
10 Beispielhaft wurde das erfindungsgemäße gpm-Gen mit Hilfe
von Plasmiden überexprimiert.

Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen
Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte
Plasmidvektoren wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and
Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKE_x1
15 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHs2-1
(Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den
kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere
Plasmidvektoren wie z. B. solche, die auf pCG4 (US-A
4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS
20 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A
5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet
werden.

Weiterhin eignen sich solche Plasmidvektoren mit Hilfe
derer man das Verfahren der Genamplifikation durch
Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es
25 beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and
Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur
Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons
beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige
30 Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt
(typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum
replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301
(Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob
35 (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)),
oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)),
pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), PCR2.1-TOPO

(Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bei dem man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die Nukleotidsequenz des für das Enzym Phosphoglycerat-Mutase codierenden Gens trägt.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem gpm-Gen weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure zu verstärken, damit eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports überexprimiert wird.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydripicolinat-Synthase codierende dapA-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- gleichzeitig ein für eine feed back resistente Aspartatkinase codierende lysC-Gen (Kalinowski et al. 5 (1990), Molecular and General Genetics 224: 317-324), oder
 - gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase codierende gap-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- 10 • gleichzeitig das für die Triosephosphat-Isomerase codierende tpi-Gen(Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
 - gleichzeitig das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase codierende pgk-Gen(Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 15 174:6076-6086), oder
- 15 • gleichzeitig das für die Pyruvat-Carboxylase codierende pyc-Gen(Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
 - gleichzeitig das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase codierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)), oder
- 20 • gleichzeitig das für den Lysin-Export codierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

25 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem gpm-Gen gleichzeitig

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen (DE 199 50 409.1, DSM 13047) und/oder

- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase codierende pgi-Gen (US 09/396,478, DSM 12969)

abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren,
5 insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des gpm-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London,
10 UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im Batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im Fed batch- (Zulaufverfahren) oder Repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 15 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 20 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 25 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden.
30

Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden natriumhaltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Lysin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demnach ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bei dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation von die L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das für das Enzym Phosphoglycerat-Mutase codierende gpm-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 10 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Die Analyse von L-Lysin kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

5 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion

des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der 5 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C 10 wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des gpm-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit 15 shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung 20 der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym 25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den 30 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring

Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990,

5 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit 10 dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin 15 Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem 20 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

25 Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembled. Die computergestützte Codierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 30 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, 35 USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 744 Basenpaaren, welches als gpm-Gen bezeichnet wurde. Das gpm-Gen codiert für ein Protein von
5 248 Aminosäuren.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5

<120> Neue für das gpm-Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990168 BT

10

<140>

<141>

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1020

<212> DNA

20

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (181)..(924)

25

<400> 1
acgcgcatca gaatgggtga agacgccgtc gaacacgcca gaacattctc ctgggcggcc 60

accgcgcac agctatcgtc gctgtacaac gacgctattg ccaacgaaaa tgtcgacggt 120

30

gaaacgcatac acggctaagt aaacgcgcgt cgtggaacat aaagtggcaa actagttac 180

atg act aac gga aaa ttg att ctt ctt cgt cac ggt cag agc gaa tgg 228
Met Thr Asn Gly Lys Leu Ile Leu Arg His Gly Gln Ser Glu Trp

1 5 10 15

35

aac gca tcc aac cag ttc act gga tgg gtc gac gtc aat ctg acc gaa 276
Asn Ala Ser Asn Gln Phe Thr Gly Trp Val Asp Val Asn Leu Thr Glu
20 25 30

40

cag ggt gag gct gag gcc aag cgc gga ggc gaa ctc ctc gtc gag gca 324
Gln Gly Glu Ala Glu Ala Lys Arg Gly Glu Leu Leu Val Glu Ala
35 40 45

45

ggc gtc ctc cca ggc gtt gta tac acc tcc ttg ctg cgt cgc gcg atc 372
Gly Val Leu Pro Gly Val Val Tyr Thr Ser Leu Leu Arg Arg Ala Ile
50 55 60

50

cgc act gca aac atc gca ctg aac gct gca gac cgc cac tgg atc cca 420
Arg Thr Ala Asn Ile Ala Leu Asn Ala Ala Asp Arg His Trp Ile Pro
65 70 75 80

55

gtg atc cgc gac tgg cgc ctc aac gag cgt cac tac ggc gca ctg cag 468
Val Ile Arg Asp Trp Arg Leu Asn Glu Arg His Tyr Gly Ala Leu Gln
85 90 95ggc ctt gac aag gct gca acc aag gaa aia tac ggc gac gac cag ttc 516
Gly Leu Asp Lys Ala Ala Thr Lys Glu Lys Tyr Gly Asp Asp Gln Phe
100 105 110

atg gaa tgg cgc cgc tcc tac gac acc cca cca cca gag ctc gcg gat 564
 Met Glu Trp Arg Arg Ser Tyr Asp Thr Pro Pro Pro Glu Leu Ala Asp
 115 120 125

5 gac gca gag tac tcc cag gca aat gac cct cgt tac gcg gac ctc gac 612
 Asp Ala Glu Tyr Ser Gln Ala Asn Asp Pro Arg Tyr Ala Asp Leu Asp
 130 135 140

10 gta gtt cca cgc acc gaa tgc ctc aag gac gtt gtg gtt cgt ttt gtt 660
 Val Val Pro Arg Thr Glu Cys Leu Lys Asp Val Val Val Arg Phe Val
 145 150 160

15 cct tac ttc gag gaa gaa atc ctg cca cgc gca aag aag ggc gaa acc 708
 Pro Tyr Phe Glu Glu Glu Ile Leu Pro Arg Ala Lys Lys Gly Glu Thr
 165 170 175

20 gtc ctc atc gca gca cac ggc aac tcc ctg cgt gcg ctg gtt aag cac 756
 Val Leu Ile Ala Ala His Gly Asn Ser Leu Arg Ala Leu Val Lys His
 180 185 190

25 ctt gac ggc atc tcc gat gct gat atc gca gag ctc aac atc cca acc 804
 Leu Asp Gly Ile Ser Asp Ala Asp Ile Ala Glu Leu Asn Ile Pro Thr
 195 200 205

30 ggc atc cca ctg gtc tac gaa atc gcc gaa gac ggt tcc gta gta aac 852
 Gly Ile Pro Leu Val Tyr Glu Ile Ala Glu Asp Gly Ser Val Val Asn
 210 215 220

35 cca ggc ggc acc tac ctc gat cct gag gca gca gca gcc ggc gca gca 900
 Pro Gly Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Glu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala
 225 230 235 240

40 gca gta gca aac cag ggt aat aag tagctatttgc taggtgagca ctcttcttgc 954
 Ala Val Ala Asn Gln Gly Asn Lys
 245

45 ttctcgatttgc ggcgtggtcc tcatgggcct cgccctacct gcgtatacga aaattaaaga 1014
 tcggat 1020

<210> 2
 <211> 248
 45 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2
 Met Thr Asn Gly Lys Leu Ile Leu Leu Arg His Gly Gln Ser Glu Trp
 1 5 10 15

Asn Ala Ser Asn Gln Phe Thr Gly Trp Val Asp Val Asn Leu Thr Glu
 20 25 30

55 Gln Gly Glu Ala Glu Ala Lys Arg Gly Gly Glu Leu Leu Val Glu Ala
 35 40 45

Gly Val Leu Pro Gly Val Val Tyr Thr Ser Leu Leu Arg Arg Ala Ile
 50 55 60

Arg Thr Ala Asn Ile Ala Leu Asn Ala Ala Asp Arg His Trp Ile Pro
65 70 75 80
5 Val Ile Arg Asp Trp Arg Leu Asn Glu Arg His Tyr Gly Ala Leu Gln
85 90 95
Gly Leu Asp Lys Ala Ala Thr Lys Glu Lys Tyr Gly Asp Asp Gln Phe
100 105 110
10 Met Glu Trp Arg Arg Ser Tyr Asp Thr Pro Pro Pro Glu Leu Ala Asp
115 120 125
Asp Ala Glu Tyr Ser Gln Ala Asn Asp Pro Arg Tyr Ala Asp Leu Asp
130 135 140
15 Val Val Pro Arg Thr Glu Cys Leu Lys Asp Val Val Val Arg Phe Val
145 150 155 160
20 Pro Tyr Phe Glu Glu Ile Leu Pro Arg Ala Lys Lys Gly Glu Thr
165 170 175
Val Leu Ile Ala Ala His Gly Asn Ser Leu Arg Ala Leu Val Lys His
180 185 190
25 Leu Asp Gly Ile Ser Asp Ala Asp Ile Ala Glu Leu Asn Ile Pro Thr
195 200 205
Gly Ile Pro Leu Val Tyr Glu Ile Ala Glu Asp Gly Ser Val Val Asn
210 215 220
30 Pro Gly Gly Thr Tyr Leu Asp Pro Glu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala
225 230 235 240
35 Ala Val Ala Asn Gln Gly Asn Lys
245

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus
5 der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von
SEQ ID No. 2,

15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
20 wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien
replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.

3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
wobei das Polynukleotid eine RNA ist.

4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,
25 enthaltend

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in
SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

5 5. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das
für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz
in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.

6. Vektor, enthaltend eine Polynukleotidsequenz nach
Anspruch 1.

10 7. Coryneformes Bakterium, enthaltend einen Vektor nach
Anspruch 6.

8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

15 a) Fermentation von die L-Aminosäure produzierenden
coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das
für das Enzym Phosphoglycerat-Mutase codierende Gen
verstärkt, insbesondere überexprimiert,

20 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen der Bakterien und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-
Aminosäure verstärkt.

25 10. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die

Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der L-Aminosäure verringern.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die Nukleotidsequenz des für das Enzym Phosphoglycerat-Mutase codierenden Gens trägt.
12. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man coryneforme Bakterien verwendet, die L-Lysin herstellen.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase codierende dapA-Gen überexprimiert wird.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig ein für eine feed back resistente Aspartatkinase codierendes lysC-Gen überexprimiert wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase codierende gap-Gen überexprimiert wird.
16. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Triosephosphat-Isomerase codierende tpi-Gen überexprimiert wird.
17. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,

daß gleichzeitig das für die 3-Phosphatglycerat-Kinase codierende pgk-Gen überexprimiert wird.

18. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Pyruvat-Carboxylase codierende pyc-Gen überexprimiert wird.
5
19. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase codierende mqo-Gen überexprimiert wird.
10
20. Verfahren gemäß Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für den Lysin-Export codierende lysE-Gen überexprimiert wird.
- 15 21. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase codierende pgi-Gen abgeschwächt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß gleichzeitig das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase codierende pck-Gen abgeschwächt wird.
20

Neue für das gpm-Gen codierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
5 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit
einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das
die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine
10 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 %
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren unter Verstärkung des für das Enzym
Phosphoglycerat-Mutase codierenden gpm-Gens.